

**Untersuchungen über die Genetik der
unterschiedlichen Aktivität der menschlichen
Serum-Paraoxoase an 18 Familien aus dem
Raum Nordbayern**

von
Werner Gebhard
aus

Tegernsee

1976
—

1977 # 64



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0082

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen über die Genetik der unterschiedlichen Aktivität der menschlichen Serum-Paraoxoase an 18 Familien aus dem Raum Nordbayern



**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg**

vorgelegt
von
Werner Gebhard
aus
Tegernsee

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin der
Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt

Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1976

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

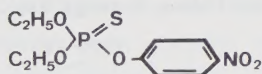
	Seite
0. EINLEITUNG	3
1. PROBLEMSTELLUNG	9
2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
2.1 Methodik der Untersuchungen	
2.1.1 Gewinnung des Serums	11
2.1.2 Versuchsvorbereitung	11
2.1.3 Inkubation mit E 600	13
2.1.4 Messen der Cholinesterase-Aktivität	15
2.1.5 Berechnen der Cholinesterase-Restaktivität	
2.2 Versuchsergebnisse	17
2.2 Auswertung	22
3. ZUSAMMENFASSUNG	26
4. LITERATURVERZEICHNIS	29

0. EINLEITUNG

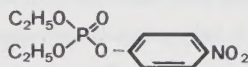
Die in den vierziger Jahren für die Schädlingsbekämpfung entdeckten Organophosphorsäureester, besonders das Parathion oder E 605 (0,0-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat), spielen auch heute noch als Insektizide eine wichtige Rolle.

Durch seine enorme Warmblüter-Toxizität beschäftigt gerade E 605 bei Vergiftungen durch unsachgemäße Anwendung, bei Suizid oder gar bei Mord immer wieder Toxikologen und Kriminalisten.

Im Warmblüterorganismus wird Parathion erst in der Leber durch Mikrosomenfermente zur eigentlich giftigen Substanz Paraoxon oder E 600 (0,0-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) oxidiert, d. h. der Schwefel gegen Sauerstoff ausgetauscht (Abb. 1).



PARATHION, E 605



PARAOXON E 600

Abb. 1: Umwandlung von E 605 in E 600

Es liegt hier also ein typischer Fall einer Giftung anstelle einer Entgiftung im Stoffwechsel vor.

Wegen der Hemmung des enzymatischen Abbaus von Azetylcholin durch Blockade der Cholinesterasen entsteht bei toxischer Dosis eine Dauerpolarisierung an den cholinergen Synapsen und somit ein Vergiftungsbild, das von Symptomen (z. B. abdominale Krämpfe, Diarrhöen, Miosis, Salivation und Muskelkrämpfe) ungehemmter parasymphatischer Aktivität gekennzeichnet ist. Der Tod kann durch Lähmung der Atemmuskulatur oder des Herzens eintreten.

Die Azetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) in Erythrozyten und Organen und die Pseudocholinesterase (EC 3.1.1.8) besonders im Serum hydrolysieren dabei die Phosphorsäureester und gehen mit dem Spaltprodukt eine relativ stabile Verbindung ein. Die Blockierung der Enzyme besteht daher längere Zeit.

ALDRIGE (1) fand 1953 als erster bei verschiedenen Tierarten zwei Serumesterasen, die sich durch ihre Hemmbarkeit durch E 600 unterschieden. Die Esterase A war gegenüber E 600 unempfindlich, während die Esterase B in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} molar gehemmt wurde. Wenig später fand ALDRIGE (2) auch im Serum von Kaninchen, Ratte und Pferd ein E 600 spaltendes Enzym (Serumparaaxonase), das sich als identisch mit der vorher beschriebenen Esterase A erwies, nicht jedoch mit der sauren oder alkalischen Phosphatase.

Der Stoffwechsel von E 605, der zu einem großen Teil in der Leber stattfindet und der schließlich auch zu dessen Abbau führt, ist inzwischen von NEAL (18) untersucht worden. Abbildung 2 zeigt die bis heute bekannten Umsetzungen.

METABOLISM of PARATHION in WARM-BLOODED ANIMALS

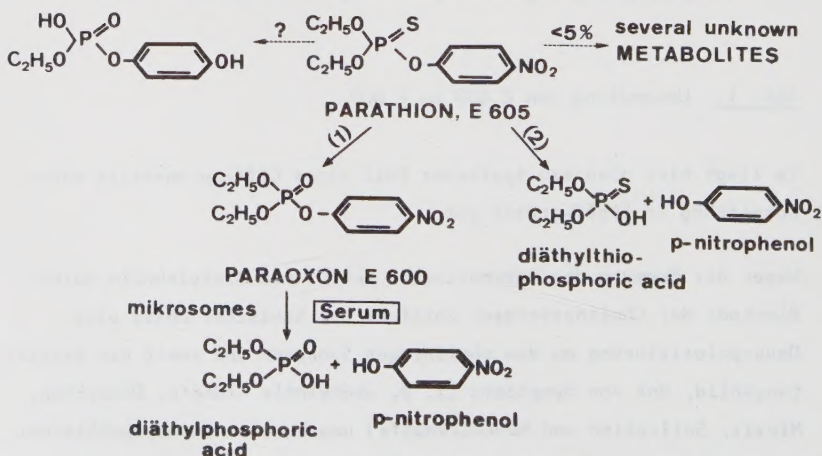


Abb. 2: Stoffwechsel von Parathion im Warmblüter nach NEAL (18)

Mit der enzymatischen Spaltung von E 600 im Blut von Warmblütern durch die Serumparaoxonase beschäftigten sich AUGUSTINSSON und HEIMBURGER(4), MAIN (17), sowie ERDÖS und BOGGS (6) noch näher.

In neuerer Zeit (1968) konnten SKRINJARIC-SPOLJAR und REINER (21), sowie KRISCH (15) unabhängig voneinander nachweisen, daß Paraoxon auch durch menschliches Serum gespalten werden kann, wobei die Konzentration weit über der für die völlige Vergiftung der Serumcholinesterase nötigen Mindestmenge lag.

Nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, PÉTÉNYI, FLÜGEL, BURGIS, DIETZEL, METZNER, NIRSCHEL und RENNER (12) ist die menschliche Serumparaoxonase ein sehr spezifisches Enzym, das schon auf geringe Veränderungen am Substratmolekül reagiert.

Bei Untersuchungen der E 600 spaltenden Aktivität im Serum von jeweils 25 Männern und Frauen hatte KRISCH (15) zwei verschiedene Personengruppen gefunden, die sich durch die Höhe der Paraoxonase-Aktivität unterschieden.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (9) haben nach Vergiftung menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 sogar drei verschiedene Vergiftungsgrade des Fermentes durch den Hemmstoff festgestellt.

Unabhängig von der Ausgangsaktivität konnten sie nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterasen mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration drei Gruppen mit niedriger (Gruppe I), mittlerer (Gruppe II) und hoher Restaktivität (Gruppe III) feststellen (siehe Tab. 1).

Tabelle 1

Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung von 50 menschlichen Serumproben ($c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar) sowie Aufteilung der Seren in drei Gruppen nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (9).

Gruppe	Personen n .	Restaktivität in % der Normalaktivität
I	30	0 - 5,5
II	10	13 - 20,5
III	10	29 - 48

Ein Maß für die Toxizität von Paraoxon ist in der Literatur häufig der I_{50} -Wert, welcher die molare Konzentration des entsprechenden Wirkstoffes angibt, die nötig ist, um die Cholinesterase-Aktivität auf die Hälfte zu erniedrigen.

So fanden ROSIVAL und Mitarb. (20) für menschliche Serumcholinesterase einen I_{50} -Wert von $0,87 \times 10^{-8}$.

Bei den Untersuchungen von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (9) wurden dagegen entsprechend den drei Gruppen folgende I_{50} -Werte ermittelt:

Gruppe	I_{50} -Wert
I	$1,6 \times 10^{-8}$
II	$2,0 \times 10^{-8}$
III	$2,6 \times 10^{-8}$

Bei den ersten Untersuchungen an 50 Personen waren bei GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (9) die höchsten und niedrigsten ermittelten Cholinesterase-Restaktivitätswerte für die einzelnen Gruppen:

- 0 - 5,5 % für die Gruppe I
- 13 - 20,5 % für die Gruppe II und
- 29 - 48 % für die Gruppe III.

Nach Untersuchung einer größeren Anzahl von Personen gaben GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (11) die Grenzwerte

für die Gruppe I mit 0 - 6 %,

für die Gruppe II mit 12 - 22 % und

für die Gruppe III mit 30 - 50 % an.

Zuletzt hat ORTLIEB (19) die Gruppengrenzen nach Untersuchung der Seren von 180 Personen nach der Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT (9) erstmals unter Berücksichtigung genetischer Gesichtspunkte festgelegt.

Als Gruppengrenzen ergaben sich dabei:

Gruppe	Cholinesterase-Restaktivität in %	
	niedrigster Wert	höchster Wert
I	0,2	6,6
II	7,6	30,1
III	35,0	66,0

BAUMGARTNER (5) untersuchte die Frage, ob die Aufteilung in drei Gruppen verschiedener Restaktivität als Polymorphismus der Serumcholinesterase oder aber als Polymorphismus der Serumparaoxonase zu deuten ist. Dabei ist es Baumgartner gelungen, eine hochsignifikante Korrelation zwischen Cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 und der fermentativen Spaltung von Paraaxon nachzuweisen.

Unter Berücksichtigung dieser Untersuchungen lassen sich die unterschiedlichen Restaktivitäten der Cholinesterasen so deuten, daß die Cholinesterase selbst keinen Polymorphismus aufweist, sondern lediglich ein empfindliches Indikatorsystem für die verbleibende E 600 Konzentration nach Inkubation und damit auch für die Aktivität des Paraaxon spaltenden Fermentes darstellt, daß also eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraaxonase-Aktivität, eine mittlere Cholinesterase-Restaktivität einer mittleren Paraaxonase-

Aktivität und eine niedrige Cholinesterase-Restaktivität einer niedrigen Paraoxonase-Aktivität darstellt.

JARCZYK (13) betrachtet die Toxizität eines insektiziden Phosphorsäureesters als das Verhältnis der enzymatischen Oxidation (Aktivierung) zur enzymatischen Hydrolyse (Entgiftung):

$$\text{Toxizität} = \frac{\text{enzymatische Oxidation}}{\text{enzymatische Hydrolyse}}$$

Aufgrund des wesentlichen Anteils, den die Serumparaoxonase bei der Entgiftung von E 600 hat, kann das bedeuten, daß Personen mit niedriger Paraoxonase-Aktivität bei der Anwendung von E 605 als Pflanzenschutzmittel gefährdeter sind.

Da die menschliche Serumparaoxonase eine starke Spezifität besitzt, bietet eine hohe Aktivität keinen besseren Schutz gegen andere Alkylphosphate, mit Ausnahme von Methyl-E 605 und Chlorthion, die nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (12) auch noch abgebaut werden.

1. PROBLEMSTELLUNG

Schon KRISCH (15) dachte bei der Aufteilung der 50 von ihm untersuchten Personen in zwei Gruppen mit verschiedener Paraoxonasenaktivität an eine genetische Ursache.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF, PÉTÉNYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (11) untersuchten den Polymorphismus der Serumparaoxonase an 35 Familien mit 52 Kindern und konnten die einzelnen Familienmitglieder wie GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (9) (siehe Seite 5) drei Gruppen verschiedener Restaktivität der Serumcholinesterasen nach Inkubation mit E 600 zuordnen. Dieser Polymorphismus ist wahrscheinlich genetisch determiniert und folgt einem einfachen 2-Allele-Modell.

Während die bimodale Verteilung nach KRISCH (15) auf einen dominant-rezessiven Erbgang schließen läßt, deutet die trimodale Verteilung nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarbeitern (9) auf ein intermediäres Prinzip der Vererbung hin.

Aufgrund umfangreicherer Untersuchungen von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (9, 11, 12) scheint die Einteilung in drei Gruppen und somit die intermediäre Vererbung wahrscheinlicher.

Der unterschiedlichen Paraoxonase-Aktivität liegen demnach zwei genetisch gleichwertige Gene zugrunde:

Bezeichnung

Ein Gen für niedrige Paraoxonase-Aktivität:

"1"

Ein Gen für hohe Paraoxonase-Aktivität:

"2"

Es ergeben sich daraus für Personen der verschiedenen Gruppen folgende Genkombinationen:

Paraoxonase-Aktivität	Genkombination und Gruppenbezeichnung
niedrig	1 - 1
mittel	2 - 1
hoch	2 - 2

Um diesen genetisch determinierten Polymorphismus durch neue Untersuchungen weiter zu klären, habe ich Seren von 18 Familien aus dem Raum Nordbayern mit der Anti-ChE-Technik untersucht, damit später auch die Verteilung der Typen in verschiedenen geographischen Gebieten verglichen werden kann.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1 Methodik der Untersuchungen

2.1.1 Gewinnung des Serums

Es wurde 66 gesunden Personen aus 18 Familien, die aus dem Raum Nordbayern stammten, mit einer Venüle ca. 10 ml Venenblut abgenommen, das dann möglichst rasch nach der Entnahme 15 Minuten lang bei 1.600 U/min zentrifugiert wurde. Es zeigte sich dabei bei keinem Serum eine Hämolyse, welche nach LINDORF (15) auch bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat wegen der Substratspezifität der Erythrozyten-Cholinesterase gegen Azytylcholin auf den Versuch keinerlei Auswirkung gehabt hätte.

Das gewonnene Serum wurde sofort abgetrennt und bei 5 °C im Kühlschrank höchstens zwei Tage bis zur Versuchsdurchführung aufbewahrt, obwohl nach LINDORF (15) die Aufbewahrung bei Raumtemperatur bis zu 8 Tagen und im Kühlschrank bis zu 4 Wochen keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität der zu untersuchenden Enzyme hat.

2.1.2 Versuchsvorbereitung

Die Serumcholinesterase-Aktivität wurde mit einer Warburg-Apparatur Typ V 85 (Abb. 3, Seite 12) der Firma Braun, Melsungen, nach der manometrischen Methode von AMMON (3) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (8), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Bedingungen der Inkubation wurden auf die nachfolgenden Aktivitätsmessungen abgestimmt (Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (9)).

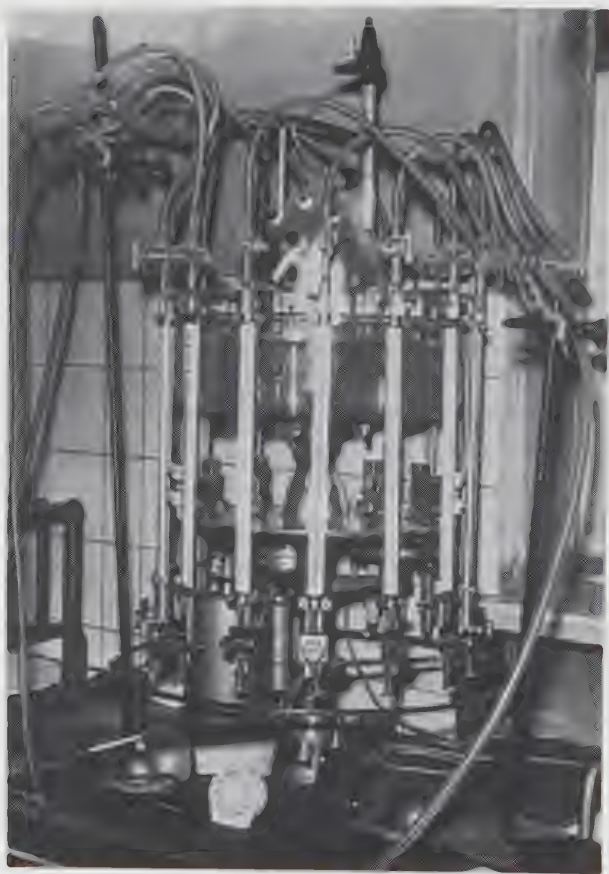


Abb. 3: Worburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Grov, Halsungen

2.1.3 Inkubation mit E 600 (Paraoxonase)

- Für die Vergiftung des Fermentes wurden $1\text{ }\mu\text{l}$ E 600 auf 90 ml aqua dest. gegeben und 8 Minuten gut im Erlenmeyerkolben durch Schütteln vermenget.
- $10\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung wurden mit 13,5 ml Verdünnungslösung wiederum 8 Minuten vermischt (Die Verdünnungslösung war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung.
- Zur Vergiftung (Inkubation) wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Lösung versetzt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war somit $c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar.
- Die Inkubationszeit betrug genau 60 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,546 %igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid enthielt (Abb. 4, Seite 14). Diese Warburggefäße wurden an ein Manometer angeschlossen und sofort in ein Wasserbad von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebracht.
- Während der letzten 20 Minuten der Inkubationszeit wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5 % CO_2 und 95 % N_2 unter Schütteln (Schüttelfrequenz 100 pro Minute) begast. Der pH-Wert lag während der Inkubation bei 7,7 (SÜLLMANN (22)).



Abb. 4 Warburggefäß mit Hauptraum und Anhangsbirne

2.1.4 Messung der Cholinesterase-Aktivität

- Nach Beendigung der Inkubation wurde die Serumverdünnung in allen Anhangsbirnen in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag nun bei 7,2 (SÜLLMANN (22)).
- Bei noch geöffneten Manometerhähnen wurde abermals 3 Minuten lang geschüttelt, danach die Manometervordifferenz abgelesen und das System geschlossen.
- Nach 15 und 30 Minuten wurde der Manometerstand notiert. Während dieser 30 Minuten blieb die Schüttelautomatik mit Ausnahme des kurzen Ablesevorgangs in Betrieb.

Die Seren wurden in Doppelbestimmungen mit und ohne E 600 auf ihre Aktivität getestet, es liefen also bei jedem Versuchsablauf zwei vergiftete und zwei unvergiftete Ansätze von jedem Serum mit. Zur Kontrolle der Eigenhydrolyse des Substrats dienten zwei Leerwerte, bei denen die Anhangsbirne der Warburggefäße 0,5 ml Verdünnungslösung, der Hauptraum 1,5 ml Butyrylcholinjodid-Lösung enthielt.

Da 14 Manometer zur Verfügung standen, konnten in einem Versuchsablauf außer den beiden Leerwerten drei verschiedene Seren geprüft werden.

Diese Doppelbestimmung wurde in einem zweiten Versuchsablauf wiederholt, so daß von jedem Serum schließlich vier Werte ohne und vier Werte nach Vergiftung vorlagen.

2.1.5 Berechnen der Cholinesterase-Restaktivität

Von den 30-Minuten-Werten wurden die vorher notierten Manometervordifferenzen abgezogen und dieser Wert mit der entsprechenden Manometerkonstanten multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet.

Die für jeden einzelnen Manometer zu bestimmende Konstante ergibt sich nach Sullmann (22) aus folgender Formel:

$$K = \frac{V_G \times \frac{273}{T} + V_F \alpha}{P_o}$$

wobei gilt:

V_G = Volumen des Gasraumes

T = Versuchstemperatur

V_F = Volumen der Flüssigkeit

α = Absorptionskoeffizient

P_o = Normaldruck

Nach Bildung des arithmetischen Mittels aus den Wertepaaren der Doppelansätze wurde der Leerwert von diesen Mittelwerten abgezogen.

Die Aktivität wird dabei in $\mu\text{l CO}_2$ pro 30 Minuten bezogen auf 0,15 ml Serum angegeben.

Das Verhältnis des ermittelten Wertes nach Vergiftung zum entsprechenden Wert ohne Vergiftung ergibt die Restaktivität in Prozent der Normalaktivität.

Auf gleiche Weise wurde der zweite Versuchsablauf ausgewertet und aus der zweifach bestimmten Restaktivität für jedes Serum wiederum das arithmetische Mittel gebildet.

Die vom Rechner auf vier Stellen nach dem Komma errechneten Restaktivitätswerte wurden auf eine Stelle nach dem Komma gerundet, was der Genauigkeit der Untersuchungsmethode entspricht.

2.2 Versuchsergebnisse

Es wurden insgesamt 66 Seren von 18 Familien mit jeweils Vater, Mutter und Kindern nach beschriebener Methodik untersucht.

Die ermittelten Cholinesterase-Restaktivitäten konnten alle einer der drei von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (9) postulierten Gruppen, in den Gruppengrenzen nach ORTLIEB (19) (siehe auch Seite 7) zugeordnet werden.

In Tabelle 2 sind die gemessenen Werte für die einzelnen Familien und deren Mitglieder und die Zuordnung dieser Werte zur entsprechenden Gruppe zusammengefaßt.

Zweimal konnten drei aufeinanderfolgende Generationen, die hier als zwei in "a" und "b" getrennte Familien erscheinen, untersucht werden. Dabei wurde ein Kind der ersten Generation (mit ⁺ gekennzeichnet) als Vater bzw. Mutter der dritten Generation nochmals aufgeführt und in die Auswertung einbezogen.

Tabelle 2

Serum-Cholinesterase-Restaktivität
nach Vergiftung mit E 600 in % der Normalaktivität

Familie	Restaktivität %	Gruppenzuordnung
1.		
<u>Brütting</u>		
Vater : Heinrich	2,1	1-1 (niedrig)
Mutter: Helga	1,3	1-1 (niedrig)
Kind : Evi	2,4	1-1 (niedrig)
Kind : Lothar	2,1	1-1 (niedrig)
Kind : Roland	1,3	1-1 (niedrig)
2.		
<u>Busch</u>		
Vater : Erich	52,4	2-2 (hoch)
Mutter: Cäcilia	17,9	2-1 (mittel)
Kind : Walter	40,4	2-2 (hoch)
3.		
<u>Dehn</u>		
Vater : Richard	1,1	1-1 (niedrig)
Mutter: Gretl	1,0	1-1 (niedrig)
Kind : Sigrid	1,0	1-1 (niedrig)
Kind : Britta	0,3	1-1 (niedrig)
4a)		
<u>Döring</u>		
Vater : Rudolf	21,4	2-1 (mittel)
Mutter: Marie	0,3	1-1 (niedrig)
Kind : Herta ⁺	1,6	1-1 (niedrig)

Familie	Restaktivität %	Gruppenzuordnung
---------	--------------------	------------------

4b)

Preckur

Vater : Eberhard	0,6	1-1 (niedrig)
Mutter: Herta ⁺	1,6	1-1 (niedrig)
Kind : Ute	0,6	1-1 (niedrig)
Kind : Rainer	3,0	1-1 (niedrig)

5.

Gebhard

Vater : Johann	1,0	1-1 (niedrig)
Mutter: Elise	27,5	2-1 (mittel)
Kind : Magda	4,7	1-1 (niedrig)
Kind : Marianne	3,6	1-1 (niedrig)
Kind : Margit	24,2	2-1 (mittel)

6.

Gebhard

Vater : Fritz	14,1	2-1 (mittel)
Mutter: Herta	13,5	2-1 (mittel)
Kind : Lothar	19,4	2-1 (mittel)
Kind : Werner	9,9	2-1 (mittel)

7.

Gumann

Vater : Heinz	1,4	1-1 (niedrig)
Mutter: Monika	1,3	1-1 (niedrig)
Kind : Berry	2,1	1-1 (niedrig)
Kind : Alexander	2,4	1-1 (niedrig)

Familie	Restaktivität %	Gruppenzuordnung
---------	--------------------	------------------

8.

Kreißl

Vater : Rudolf	15,2	2-1 (mittel)
Mutter: Ruth	8,9	2-1 (mittel)
Kind : Dietmar	38,8	2-2 (hoch)
Kind : Ulrike	0,2	1-1 (niedrig)

9.

Mantel

Vater : Josef	2,1	1-1 (niedrig)
Mutter: Liesel	51,5	2-2 (hoch)
Kind : Wolfgang	19,7	2-1 (mittel)

10a)

Metzger

Vater : Karl	3,1	1-1 (niedrig)
Mutter: Marie	13,5	2-1 (mittel)
Kind : Anton ⁺	0,7	1-1 (niedrig)

10b)

Metzger

Vater : Anton ⁺	0,7	1-1 (niedrig)
Mutter: Erna	1,0	1-1 (niedrig)
Kind : Marga	0,4	1-1 (niedrig)
Kind : Christa	2,4	1-1 (niedrig)

11.

Reutter

Vater : Rudolf	28,3	2-1 (mittel)
Mutter: Lydia	0,6	1-1 (niedrig)
Kind : Edith	0,8	1-1 (niedrig)
Kind : Doris	29,1	2-1 (mittel)

Familie	Restaktivität %	Gruppenzuordnung
12.		
<u>Rothe</u>		
Vater : Norbert	5,4	1-1 (niedrig)
Mutter: Edith	2,8	1-1 (niedrig)
Kind : Frank	6,6	1-1 (niedrig)
13.		
<u>Schöttler</u>		
Vater : Helmuth	22,2	2-1 (mittel)
Mutter: Ursula	21,8	2-1 (mittel)
Kind : Evy	0,8	1-1 (niedrig)
14.		
<u>Vogel</u>		
Vater : Hans	27,6	2-1 (mittel)
Mutter: Erna	21,8	2-1 (mittel)
Kind : Alex	18,2	2-1 (mittel)
15.		
<u>Wagenknecht</u>		
Vater : Karl	17,6	2-1 (mittel)
Mutter: Christine	8,1	2-1 (mittel)
Kind : Hans	26,1	2-1 (mittel)
Kind : Wolfgang	1,0	1-1 (niedrig)
Kind : Dorothea	0,3	1-1 (niedrig)
Kind : Stephanie	37,5	2-2 (hoch)
16.		
<u>Weber</u>		
Vater : Kurt	1,0	1-1 (niedrig)
Mutter: Resi	44,2	2-2 (hoch)
Kind : Gerhard	15,4	2-1 (mittel)

2.3 Auswertung

Zunächst bestätigte sich eine ähnliche Verteilung der Restaktivitätswerte der untersuchten Personen in den drei Gruppen, wie bei früheren Serumuntersuchungen nach gleicher Methode durch GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (10, 11).

Über die Hälfte der Probanden hatten dabei eine niedrige Paraoxonase-Aktivität, während mittlere Aktivitäten weniger häufig und hohe am seltensten auftraten.

Bei den 66 untersuchten Personen ergab sich die folgende Verteilung in den drei Gruppen:

Gruppe/Einstufung	Anzahl der Personen	Prozentualer Anteil der Gruppe
I "niedrig"	36	54,5 %
II "mittel"	24	36,4 %
III "hoch"	6	9,1 %
	66	100 %

Betrachtet man nun die Untersuchungsergebnisse im Hinblick auf die Vererbung der drei verschiedenen Genotypen ("niedrig", "mittel" und "hoch") bei den sechs möglichen Typenkombinationen der Elternpaare und die auftretende Typenverteilung bei den Kindern, so ergibt sich die Zusammenstellung von Tabelle 3.

Tabelle 3

Aufteilung der 18 Familien nach elterlichen Typenkombinationen und die auftretenden Typen bei den einzelnen Kindern.

Genkombinationen der Eltern	Familie Nr.	Kinder			
		1	2	3	4
1-1 und 1-1	1	1-1	1-1	1-1	
	3	1-1	1-1		
	4b	1-1	1-1		
	7	1-1	1-1		
	10b	1-1	1-1		
1-1 und 2-1	4a	1-1			
	5	1-1	1-1	2-1	
	10a	1-1			
	11	1-1	2-1		
1-1 und 2-2	9	2-1			
	16	2-1			
2-1 und 2-1	6	2-1	2-1		
	8	2-2	1-1		
	13	2-1			
	14	2-1			
	15	2-1	1-1	1-1	2-2
2-1 und 2-2	2	2-2			
2-2 und 2-2	keine				

Die Typenverteilung bei den Kindern entsprach dabei genau einem intermediärem Erbgang nach einem einfachen 2-Allele-System. Es trat somit in keinem Fall ein Paraoxonase-Typ auf, der bei diesem Erbgang nicht möglich gewesen wäre.

Bei den Familien 1, 3, 4b, 10b und 12 gehören sowohl der Vater als auch die Mutter der homozygoten niedrigen Gruppe (1-1) an und alle 12 Kinder weisen ebenfalls dieselbe Gruppenzugehörigkeit auf.

Aufgrund der Seltenheit von Personen mit hoher Paraoxonase-Aktivität ergab sich die andere Kombination gleichartiger homozygoter Eltern ($2-2 \times 2-2$) nicht.

War wie bei den Familien 9 und 16 ein Ehepartner "niedrig" (1-1) und der andere "hoch" (2-2), so zeigten die beiden Kinder, entsprechend einer intermediären Vererbung, die heterozygote Genkombination (2-1).

Die bisher beschriebenen Fälle entsprechen der Mendelschen Uniformitätsregel, die besagt, daß Individuen der ersten Filialgeneration "reinrassiger" Eltern immer gleichartig sind.

Sehr interessant ist das Auftreten des heterozygoten mittleren Typs bei den Eltern (Paarungen $2-1 \times 2-1$; $2-1 \times 1-1$; $2-1 \times 2-2$), da sich dann die Kinder auf mehrere Typen verteilen können.

Gehört ein Elternteil der mittleren und der andere der niedrigen Gruppe an (Familien 4a, 5, 10a und 11), können die Kinder sowohl "niedrig" (hier 5 Kinder) als auch "mittel" (hier 2 Kinder) sein. Ähnlich ist es bei der Paarung $2-1 \times 2-2$ (nur Familie 2). Die Kinder können der mittleren oder, wie in diesem Falle das einzige Kind, der hohen Gruppe angehören.

Besonders deutlich wird der intermediäre Erbgang bei der Auswertung der Familien 6, 8, 13, 14 und 15, bei denen beide Elternteile jeweils heterozygot (2-1) sind.

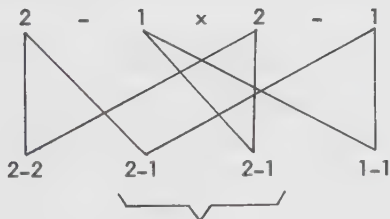
Nach der Mendelschen Spaltungsregel spaltet sich nämlich die Filialgeneration (Kinder) heterozygoter Elternpaare immer in dem Verhältnis 1 : 2 : 1 auf, wobei die eine Hälfte wieder heterozygot, die andere homozygot ist.

Von den 10 Kindern der hier untersuchten Familien gehörten drei der niedrigen, fünf wieder der mittleren und zwei der hohen Gruppe an.

Die möglichen Genaufspaltungen bezogen auf Eltern mit jeweils mittlerer Paraoxonase-Aktivität (2-1) veranschaulicht folgende Skizze:

Elterngeneration

Auftretende Typen in
der Filialgeneration



Zu erwartende prozentuale

Verteilung nach Mende

25 %

50 %

25 %

Prozentuale Verteilung

der 10 Kinder

20 %

50 %

30 %

Trotz der relativ geringen Zahl von 10 Kindern traten sie doch ziemlich genau in der zu erwartenden prozentualen Verteilung der drei Genotypen auf.

3. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden 66 Seren von 18 Familien aus Nordbayern auf die unterschiedliche Vergiftbarkeit der menschlichen Serum-Cholinesterase nach Inkubation mit E 600 (0,0-Diäthyl-0-(p-nitrophenyl)-phosphat, Paraoxon) untersucht.

Diese verschiedene Restaktivität der Serum-Cholinesterase wurde nach der Anti-ChE-Technik (siehe Seite 11 - 16) erstmals von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (9) ermittelt und beruht nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, BAUMGARTNER et al. (10) auf einer unterschiedlichen Aktivität des E 600-spaltenden Enzyms Paraoxon.

Die von mir gefundenen Werte ließen sich in drei von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (9) postulierte, eindeutig begrenzte Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Paraoxonase-Aktivität (neue Bezeichnung 1-1, 2-1 und 2-2) einordnen.

Schon 1973 hatte GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (11) vermutet, daß der Polymorphismus der Paraoxonase genetisch determiniert sei und durch ein einfaches 2-Allele-System bei intermediärem Erbgang zu deuten wäre.

Der unterschiedlichen Paraoxonase-Aktivität liegen demnach zwei genetisch gleichwertige, allele Gene, eines für hohe (Bezeichnung 2) und eines für niedrige Aktivität (Bezeichnung 1) zugrunde. Bei intermediärem Erbgang treten so drei Phäno- und gleichzeitig Genotypen mit niedriger (1-1), mittlerer (2-1) und hoher (2-2) Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 auf.

Bei den von mir untersuchten 18 Familien bestätigte sich die These eines intermediären Erbgangs der drei Paraoxonase-Typen ohne Ausnahme.

Bei den Eltern ergaben sich dabei fünf der sechs möglichen Typen-kombinationen, und zwar:

- | | |
|--------------------|-------------|
| 1. niedrig-niedrig | 1-1 und 1-1 |
| 2. niedrig-mittel | 1-1 und 2-1 |
| 3. niedrig-hoch | 1-1 und 2-2 |
| 4. mittel-mittel | 2-1 und 2-1 |
| 5. mittel-hoch | 2-1 und 2-2 |

Einem intermediärem Erbgang entsprechend ergaben sich bei den Kindern folgende Verteilung der Paraoxonase-Typen:

Paarungsmöglichkeit:

- zu 1. Alle Kinder gehören auch wieder der Gruppe I (1-1) an.
- zu 2. Die Kinder besitzen entweder niedrige oder mittlere Paraoxonase-Aktivität.
- zu 3. Alle Kinder besitzen mittlere Aktivität.
- zu 4. Die 10 Kinder spalten sich sogar fast genau in der zu erwartenden Verteilung in drei Typen auf:

	G r u p p e		
	"niedrig"	"mittel"	"hoch"
Zu erwartende prozentuale Verteilung	25 %	50 %	25 %
Prozentuale Verteilung der 10 Kinder	30 %	50 %	20 %

- zu 5. Hier tritt das eine Kind in der "hohen" Gruppe auf. Theoretisch wäre auch ein mittlerer Typ möglich gewesen.

Tabelle 4 veranschaulicht nochmals die Verteilung der Kinder der verschiedenen Paarungen.

Tabelle 4

Verteilung der Kinder bei den verschiedenen möglichen Paarungen der Paraoxonasetypen.

Eltern		Kinder			
Typenkombination	Familien	Anzahl	Typ		
			1-1	2-1	2-2
	n	n	n	n	n
1-1 x 1-1	6	12	12	-	-
1-1 x 2-1	4	7	5	2	-
1-1 x 2-2	2	2	-	2	-
2-1 x 2-1	5	10	3	5	2
2-1 x 2-2	1	1	-	-	1
2-2 x 2-2	-	-	-	-	-
	18	32	20	9	3

Bei Beurteilung früherer (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und Mitarb. (11)) und meiner Untersuchungsergebnisse, scheint also der Polymorphismus der menschlichen Paraoxonase genetisch tatsächlich einem einfachen 2-Allele-System bei intermediärem Erbgang zu folgen.

Die vorliegende Familienuntersuchung stellt darüber hinaus auch einen Beitrag zur Prüfung einer regional unterschiedlichen Verteilung der drei Paraoxonasetypen dar.

4. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ALDRIGE, W.N.: Serumesterases. 1. Two types of esterases (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem. J.* 53 (1953a) 110.
- (2) ALDRIGE, W.N.: Serumesterases. 2. An enzyme, hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-Esterase of mammalian sera. *Biochem. J.* 53 (1953b) 117.
- (3) AMMON, R.: Die fermentative Spaltung des Acetylcholins. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* 233 (1934) 486.
- (4) AUGUSTINSSON, D.B.; HEIMBURGER, B.: Enzymatic hydrolysis of organophosphorus compounds. I - VI. *Acta chem. scand.* 8 (1954) 753, 762, 915, 1533; 9 (1955) 310, 383.
- (5) BAUMGARTNER, W.: Untersuchungen über einen Zusammenhang zwischen fermentativem E 600 Abbau und Vergiftung der Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum. Dissertation Universität Erlangen (1970).
- (6) ERDÖS, E.G.; BOGGS, L.E.: Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood. *Nature* 190 (1961) 716.
- (7) FISCHER, R.: Erste Untersuchungen zur Geschlechts- und Altersabhängigkeit der menschlichen Serum-Cholinester-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 für eine Gruppe süddeutscher Probanden. Dissertation Universität Erlangen (1975).

- (8) FRIEDBERG, K.D.; SAKAI, F.: Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten (E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktiveringenden Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methjodid, RAM). Dt. Z. f. gerichtl. Medizin 47 (1968) 580.
- (9) GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; RABAST, U.; LINDORF, H.H.: Unterschiedliche Reaktionen menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat). Arch. Toxikol. 25 (1969) 223.
- (10) GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; BAUMGARTNER, W.; PÉTÉNYI, M.; BURGIS, H.; LINDORF, H.H.; METZNER, H.: Korrelation zwischen der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-Systems in menschlichen Seren. Hoppe-Syler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 217 - 220.
- (11) GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; LINDORF, H.H.; PÉTÉNYI, M.; FLÜGEL, M.; FISCHER, T.; HILLER, T.: Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase. Humangenetik 17 (1973) 331 - 335.
- (12) GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.; PÉTÉNYI, M.; FLÜGEL, M.; BURGIS, H.; DIETZEL, B.; METZNER, H.; NIRSCHEL, H.; RENNER, O.: Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase. Hoppe-Syler's Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 337 - 340.
- (13) JARCZYK, H.J.: Der Einfluß von Esterasen in Insekten auf den Abbau von Phosphorsäureestern der E 605-Reihe. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 19 (1966) 1.

- (14) KIMMERLE, G.; LORKE, D.: Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 21 (1968) 111.
- (15) KRISCH, K.: Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat (E 600) durch menschliches Serum. Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6 (1968) 41.
- (16) LINDORF, H.H.: Untersuchungen zu Ursache der unterschiedlichen Reaktion menschlicher Serum-Cholinesterasen mit E 600. Dissertation Universität Erlangen (1971).
- (17) MAIN, A.R.: The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum. Biochem. J. 74 (1960) 10.
- (18) NEAL, R.A.: Enzymatic mechanism of metabolism of the phosphorothionate insecticides. Arch. Intern. Med 128 (1971) 118.
- (19) ORTLIEB, R.: Dissertation Universität Erlangen in Vorbereitung.
- (20) ROSIVAL und Mitarbeiter: Toxikologia a farmako biodynamika organofosforovych zlucenin, Bratislava 1959. Zit. nach KIMMERLE und LORKE (13).
- (21) SKRINJARIC-SPOLJAR, M.; REINER, E.: Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenyl-ethylphosphate by human sera. Biochem. Biophys. Acta 165 (1968) 289.
- (22) SÜLLMANN, E.: Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebestoffwechsels, in: Handbuch der physiologisch- und pathol.-chem. Analyse, herausgegeben v. K. Lang und E. Lehnartz, Band VI A, Teil A Berlin: Springer-Verlag 1964.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die freundliche Übernahme des Korreferenten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für Ihre große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und die jederzeit freundlich erteilten wertvollen Ratschläge.

Danken möchte ich auch Herrn Opitz für die Anfertigung der beiden Abbildungen zur Warburg-Apparatur.

Lebenslauf

Name : Werner Gebhard

geboren am : 10. September 1951

in : Tegernsee

Staatsangehörigkeit: deutsch

Namen der Eltern : Fritz Gebhard, Zahnarzt
Herta Gebhard, geb. Drexler

Schulbildung : 1958 - 1965 Volksschule Hüttenbach
1965 - 1968 Staatliche Realschule Lauf
1968 - 1971 Gymnasium Hersbruck

Studiengang : WS 1971/72 Studium von Physik und Geologie an
der Universität Erlangen-Nürnberg
SS 1972 -
SS 1976 Studium der Zahnheilkunde an der
Universität Erlangen-Nürnberg

Prüfungen : Abitur im Juni 1971
Vorphysikum im Juli 1972
Physikum im März 1974
Zahnmedizinisches Staatsexamen im November 1976

Erlangen, im Dezember 1976

Werner Gebhard

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990